

УДК 576.895.1:595.7+577.152.4

© 1990

ЛИЗОЦИМ В ПАРАЗИТО-ХОЗЯИННЫХ ОТНОШЕНИЯХ ГЕЛЬМИНТОВ И НАСЕКОМЫХ

И. М. Нагорная, Р. В. Андреева, Н. М. Исаева

При исследовании личинок слепней и комаров, пораженных гельминтами, в их гемолимфе выявлено повышенное содержание лизоцима. Обнаружен также высокий уровень лизоцима в тканях паразитических личинок гельминтов и секрция его в окружающую среду. Обсуждается роль лизоцима в паразито-хозяйинных отношениях.

Почти два десятилетия проводятся исследования возможностей ограничения численности вредных членистоногих с помощью гельминтов. Среди полостных паразитов кровососущих двукрылых наиболее обычны мермитиды (Nematoda, Mermithida) и гордииды (Cephalorhyncha, Gordiacea), отдельные черты биологии которых сходны. Высокий уровень инвазии насекомых на различных стадиях их развития, отмеченный для мермитид 20—60 % (Исаева, 1980) и гордид 20—66 % (Андреева, 1984), их специфичность и пролонгированное воздействие в очагах развития хозяев привлекают внимание исследователей.

В очагах инвазии насекомых происходит чередование непитающихся свободн-живущих стадий паразита (инвазионных личинок, постпаразитических личинок, половозрелых особей) и питающихся, к которым относятся лишь паразитические личинки. Рост гельминтов сопровождается истощением жирового тела и органов кроветворения, а также паразитарной кастрацией хозяина. После выхода паразитов ослабленные насекомые-хозяева обычно погибают от бактериозов.

Основная часть публикаций посвящена изучению жизненных циклов гельминтов и хозяев, их сопряженности, проблемам культивирования мермитид; наименее исследованными остаются особенности воздействия гельминтов и защитные реакции насекомых.

Типичной защитной реакцией беспозвоночных на внедрение многоклеточного паразита является инкапсуляция, при которой последний окружается оболочкой из разрушенных и целых гемоцитов. Вещество капсулы состоит из комплекса белок/полифенол. У личинок двукрылых, обладающих низким числом клеток крови, обнаружена гуморальная инкапсуляция нематод, осуществляемая без участия гемоцитов (Götz, 1969). Кроме того, в качестве гемоцеломического барьера могут рассматриваться гуморальные факторы гемолимфы хозяина (Weathersby, 1975). Повреждение гемоцитов, участвующих в клеточной защитной реакции, сопровождается освобождением из них гидролитических ферментов, в том числе и лизоцима, быстрое повышение уровня которого происходит обычно в ответ на внедрение чужеродных агентов. Лизоцим (КФ 3. 2. 1. 17) — фермент, обладающий способностью гидролизовать аминсахара, а также мукополисахариды опорных мембран бактериальных клеток, разрывая

1—4 глюкозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой.

Ввиду недостаточной изученности роли гуморальных факторов во взаимоотношениях хозяев и гельминтов нами предпринято исследование уровня лизоцима у здоровых и пораженных гельминтами личинок слепней и комаров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали личинок IV—VI возрастов слепня большого серого, здоровых и инвазированных гордидами *Gordius borisphaenicus* Spir., а также личинок комаров рода *Aedes* IV возраста, здоровых и зараженных мермитидами *Romanotermis nielsenii*, собранных в естественных очагах гельминтозов в Киевской обл. Материал исследован в двух повторностях, средняя проба составляла 5—15 личинок. В лабораторных условиях личинок слепней и комаров содержали до выхода постпаразитов.

Гемолимфу личинок слепней получали, прокалывая покровы в области межсегментных сочленений. Гомогенаты тканей готовили на 0.9 %-ном стерильном растворе хлорида натрия, центрифугировали при 5 тыс. об./мин. Паразитических и постпаразитических личинок гельминтов, промытых раствором Рингера, инкубировали в 2 мл этого раствора от 2 до 24 ч при 20 или 4° в соответствии с экологическими требованиями паразитов. В гемолимфе, супернатанте и инкубационной среде определяли ферментативную активность лизоцима методом диффузии в агар (Лабинская, 1978), а также белок по Лоури (Lowry e. a., 1951). В качестве субстрата использовали ацетоновый порошок клеток *Micrococcus lysodeikticus*, агаровый гель готовили на фосфатном буфере pH 6.8. Для оценки литической активности использовали серию стандартных растворов кристаллического яичного лизоцима отечественного производства. Содержание лизоцима в пробах выражали в мкг/мл исследуемой жидкости, мкг/мг ткани или мкг/мг белка пробы. Активность амилазы определяли по методу Смита и Роя, протеазы — Ансона и Мирского (Вилкова, 1976). Статистическую обработку результатов осуществляли по Плохинскому (1980).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В организме личинок слепней, инвазированных гордидами, выявлены следующие изменения, обусловленные развитием паразитов. Внутренние органы хозяев, в особенности жировое тело, мальпигиевы сосуды и средняя кишка, составляют в среднем 2/3 их массы у здоровых особей. Снижается pH гемолимфы до 7.33 по сравнению с 7.64 в норме, а уровень содержания белка до 75.8 % от показателя здоровых насекомых. Изменяется ферментативная активность гемолимфы инвазированных личинок: незначительно увеличивается амилолитическая и более чем вдвое — протеолитическая активность (при pH 6.8), очевидно, за счет ферментов, продуцируемых гордидами.

Уровни лизоцимной активности гомогенатов указанных выше органов здоровых и инвазированных насекомых отличаются незначительно. В то же время в гемолимфе инвазированных слепней уровень содержания фермента выше, чем у здоровых, причем наиболее высокое значение ($p < 0.01$) отмечено на ранних этапах паразитирования, когда личинки гордиид обладают бесцветной, проницаемой кутикулой (см. таблицу). Перед выходом из хозяина их покровы значительно уплотняются, становятся глянцевыми, темно-коричневыми. При этом содержание лизоцима (на мг белка) в гемолимфе хозяев несколько снижается, но все-таки остается более высоким, чем у незараженных особей ($p < 0.01$).

Сравнение лизоцимной активности гомогенатов паразитических и постпаразитических личинок гордиид показывает, что самым высоким уровнем обладают

Уровень лизоцима и белка в гемолимфе личинок слепня большого серого

Масса		Гемолимфа		
слепней	гордиид	лизоцим, мкг/мл	белок, мг/мл	лизоцим белок мкг/мг
Здоровые				
429.29±23.84		12.00±0.79	70.43±10.78	0.19±0.04
Инвазированные				
426.80±29.45	56.17±9.98 *	28.80±6.29	53.40±6.93	0.54±0.08
520.07±39.39	60.67±12.11 **	18.57±3.71	53.66±9.04	0.35±0.02

Примечание. * — гельминты на ранних этапах паразитирования; ** — гельминты перед выходом из хозяина.

особи на начальных этапах развития в хозяине (0.43 ± 0.04 мкг/мг). Уровень лизоцима достоверно снижается у паразита к моменту выхода из хозяина и у постпаразитических гордиид (соответственно 0.15 ± 0.03 и 0.23 ± 0.06 мкг/мг).

Таким образом, повышенное содержание лизоцима в тканях молодых паразитических гельминтов совпадает с наиболее высоким уровнем его в гемолимфе хозяина (см. таблицу). Чтобы проверить возможность секреции лизоцима гельминтами в полость тела хозяина, инкубировали паразитических и постпаразитических гельминтов в изотоническом растворе Рингера. В инкубационной среде постпаразитических гордиид активность этого фермента не была выявлена. Результаты анализа инкубационной среды паразитов в разные периоды их развития показали, что на ранних этапах уровень лизоцима выше, чем в конце паразитирования (0.60 мкг/мл и 0.02 соответственно). Это позволяет предполагать, что повышение уровня фермента в гемолимфе инвазированных насекомых происходит преимущественно за счет секреции его паразитами. Способность секретировать лизоцим подтверждена также методом аппликации паразита на агаровом геле, содержащем клетки *M. lysodeikticus*. В этом случае заметный лизис субстрата наблюдали вдоль передней части тела гельминта.

Подобные исследования проводили и на мермитидах — паразитах комаров. Уровень лизоцима в гомогенатах паразитических личинок *R. nielsenii* составил 1.57 ± 0.28 мкг/мг, а постпаразитических — 0.62 ± 0.05 мкг/мг массы тела. В инкубационной среде постпаразитических личинок лизоцимная активность не выявлена, тогда как уровень этого фермента в среде при инкубации паразитических мермитид (в течение 24 ч при 4°) достигал 6 мкг/мл. Таким образом, паразитические личинки мермитид и гордиид способны выделять лизоцим, а постпаразитические личинки такой способностью не обладают.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Уровень лизоцима в гомогенатах паразитических личинок исследованных видов на ранней стадии развития достоверно выше, чем у особей, готовящихся покинуть хозяина, и у постпаразитических стадий. Таким образом, ткани гельминтов, развивающихся в гемоцеле насекомого, отличаются высоким содержанием лизоцима, так же как и гемолимфа хозяина. Корреляция между высоким уровнем лизоцима и интенсивным ростом тканей показана для стафилококков (Афанасьева и др., 1976) и растений (Pilet e. a., 1983). Можно заключить, что и у гельминтов высокий уровень лизоцима связан с процессом интенсивного роста.

Инвазированные и здоровые личинки слепней почти не отличаются по уровню содержания исследуемого фермента в отдельных органах, в гемолимфе зара-

женных насекомых он заметно выше. Доказано, что в период паразитирования указанные гельминты способны выделять собственный лизоцим в окружающую среду и, по-видимому, в гемоцель хозяина. Это явление можно трактовать неоднозначно. Повышение уровня лизоцима в организме хозяина за счет секреции фермента паразитами может, во-первых, обеспечивать повышение резистентности как хозяина, так и паразита к другим патогенам, прежде всего к микроорганизмам. Увеличивая жизнеспособность хозяина, гельминты обеспечивают себе возможность успешно завершить период паразитирования.

Повышение гельминтом уровня лизоцима хозяина-насекомого можно также расценивать как стимуляцию иммунитета последнего. Как известно, при внедрении чужеродных агентов в организм насекомого, повышение уровня лизоцима гемолимфы является одним из первых событий в формировании иммунного ответа. Дальнейшее его развитие связано с синтезом ряда бактериолитических белков (Hultmark e. a., 1980). Полагают, что лизоцим является молекулой-сигналом, инициирующей синтез защитных белков, обладающих широким спектром бактериолитической активности (Hoffman, 1983).

В пользу предположения о повышении резистентности системы гельминт-насекомое свидетельствуют единичные факты встречаемости смешанных инфекций и инвазий в природных очагах мермитозов, а также крайне редкие случаи поражения гельминтов в период паразитирования такими распространенными патогенами как микроспоридии, вирусы (Бучацкий, Исаева, 1986). При одновременном паразитировании мермитид и микроспоридий в комарах установлено угнетение спорогонии простейших за счет неидентифицированных метаболитов мермитид (Килочицкий, 1980), тогда как обычно защитных реакций комаров оказывается недостаточно для подавления микроспоридиоза. Сравнение микрофлоры здоровых и инвазированных мермитидами личинок восточного майского хруща показало, что групповой состав микроорганизмов у здоровых особей почти в 3 раза больше, чем у инвазированных гельминтами, что предполагает возможность выделения мермитидами каких-то антибактериальных веществ (Артюховский, 1976).

Не менее важным является то, что лизоцим, секретируемый гельминтами, может способствовать осмотическому поглощению питательных веществ, повышая проницаемость клеточных мембран тканей хозяина для пищеварительных ферментов гельминтов. Аналогичная функция принадлежит лизоциму слюнных желез при внекишечном пищеварении личинок слепней (Андреева, Нагорная, 1987).

Выявленный на данном этапе исследований факт секреции паразитом бактериолитического белка, повышающего иммунный статус хозяина, открывает новую сторону во взаимоотношениях системы насекомое—гельминт.

Список литературы

- Андреева Р. В. Экология личинок слепней и их паразитозы. Киев: Наукова думка, 1984. 170 с.
- Андреева Р. В., Нагорная И. М. Питание почвообитающих личинок слепней (Diptera, Tabanidae) // Почвенная фауна и почвенное плодородие. М.: Наука, 1987. С. 258—259 (Тр. 9-го Международ. colloквиума).
- Артюховский А. К. К микрофлоре здоровых и гельминтозных личинок восточного майского хруща (*Melolontha hippocastani* L.) // 8-е Всесоюз. совещ. по нематодным болезням с.-х. культур (Тез. докл.), Кишинев, 1976. С. 161.
- Афанасьева Т. И., Леоненко В. А., Бердзулишвили Э. М., Богданов Л. Ф., Соловьева В. Е., Кравченко Н. А., Черкасов И. А., Соболев В. Р. О значении лизоцимподобного фермента стафилококков в их патогенности // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиология. 1976. № 12. С. 43—47.
- Бучацкий Л. П., Исаева Н. М. Электронно-микроскопическое изучение репродукции иридовirusа комаров в паразитических личинках // 10-я конф. УРНОП. Ч. 1. 1986. С. 100.
- Вилкова Н. А. Активность гидролитических ферментов фитофага как показатель антибиотического воздействия на растения // Методы исследования патологических изменений растений. М.: Колос, 1976. С. 67—72.

- Исаева Н. М. Мермитида кровососущих комаров *Culicimermis schakhovi* Rubt. et Isaeva, 1975 (Nematoda) и ее взаимоотношения с хозяевами // Автореф. дис. . . . канд. биол. наук. Киев, 1980. 21 с.
- Килочик П. Я. Микроспоридии кровососущих комаров долины Днепра, Причерноморья и Крыма, их взаимоотношения с хозяевами и другими паразитами // Автореф. дис. . . . канд. биол. наук. Киев, 1980. 23 с.
- Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. 178 с.
- Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии. М.: Изд-во МГУ, 1980. 150 с.
- Götz P. Die Einkapselung von parasiten in der Hämolymphe von Chironomus-Larven (Diptera) // Zool. Anz. Suppl. 1969. Bd 33. S. 610—617.
- Hoffman D. Les mecanismes de defense chez les insectes // Bull. Inst. Pasteur. 1983. T. 81, N 3. P. 259—264.
- Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T., Boman H. Insect immunity Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from haemolymph of immunised pupae // J. Biochem. 1980. Vol. 106, N 1. P. 7—16.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, N 1. P. 265.
- Pilet P., Jolles J., Jolles P. Lysozym in growing plant tissue cultured in vitro // L. Pflanzenphysiol. 1983. Bd 111, H. 1. S. 91—94.
- Weathersby A. B. The haemocoel as barrier to parasite infection in insects // Inverteb. immunity. Ed. K. Maramorosch. R. Shope: Acad. Press, 1975. P. 273—288.

Институт зоологии
им. И. И. Шмальгаузена АН УССР

Поступила 16.02.1989

LYSOZYME IN HOST-PARASITE RELATIONS OF HELMINTHS AND INSECTS

I. M. Nagornaya, R. V. Andreeva, N. M. Isaeva

SUMMARY

The ability of different helminths to secrete lysozyme during their development has been revealed. Postparasitic larvae of the helminths and mature individuals do not possess such an ability. The level of lysozyme contents in the host's haemolymph depending on the degree of parasite's maturity as well as its contents in non-infected insects was studied. The role of helminth's lysozyme as a factor of the rise of non-specific resistance of the host-parasite system is discussed.